

Protocolos de Microalgas de la Red RENUWAL (I)



* ISBN: 978-84-15413-46-2

* Editorial: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el D

* Título: PROTOCOLOS DE MICROALGAS DE LA RED RENUWAL

* Editor general: GOUVEIA, LUISA ; NAVARRO LLORENS, JUANA MARIA

* Formato del producto: Digital: descarga y online
Detalle Formato: PDF ; Formato fijo

* Idioma de publicación: Español / Castellano

* Número de edición: 1

* Fecha de edición: 26/04/2022

País de edición: España

Materia destacada Thema: RNU : Sostenibilidad

* Materia destacada IBIC: RNU : Sostenibilidad

* Estado en la editorial: Activo

* Disponibilidad: Disponible. Sin detalles

* Precio: España
01 (Gratis)

Las microalgas pueden ser utilizadas para la recuperación de nutrientes contenidos en diversos efluentes, contribuyendo de esta forma a la mejora de la sostenibilidad de multitud de procesos. Sin embargo, para poder conseguir procesos eficientes es necesario evaluar con detalle cada aplicación en función de los efluentes que se van a procesar. Dependiendo del proceso, la biomasa algal obtenida puede tener interés para su aplicación en distintos sectores y productos finales con diferente valor añadido, i.e., farmacéutico, cosmético, agroalimentario-ganadero-acuícola, ambiental, químico o incluso energético.

En el año 2019, varios grupos de investigación pertenecientes a diferentes países iberoamericanos junto con 6 empresas que trabajan con microalgas se unieron para solicitar al programa de Redes de la CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; <https://www.cytmed.org/es/cytmed>) la creación de una red temática para el tratamiento de efluentes con microalgas. Las Redes Temáticas que subvenciona este organismo, son asociaciones de grupos de investigación y desarrollo (I+D) de entidades públicas o privadas y empresas de los países miembros del Programa CYTED, cuyas actividades científicas o tecnológicas están relacionadas dentro de un ámbito común de interés y enmarcadas en una de las Áreas del Programa. En nuestro caso, la red se solicitó por el área industrial. La red RENUWAL 320RT0005 fue concedida en esta convocatoria del 2019 para iniciarse en el año 2020 durante un periodo de 4 años que, con motivo de la Pandemia, se ha extendido hasta el 2024 (<https://www.cytmed.org/es/renuwal>).

Las redes CYTED tienen como objetivo general el intercambio de conocimientos entre grupos de I+D y la potenciación de la cooperación como método de trabajo. El objetivo principal de la Red RENUWAL, es disponer de una Red multi- e interdisciplinar que permita la sinergia necesaria para impulsar las aplicaciones potenciales de las microalgas como agentes de reciclaje para la industria y el medioambiente en el marco de la Economía Circular. Para ello se analizan e implementan los procedimientos disponibles basados en microalgas que permitan el desarrollo de nuevas estrategias sostenibles de valorización de la biomasa algal. Como objetivos específicos de la propuesta, la Red trabaja en tres ejes distintos: a) Gestión del conocimiento; b) Gestión de la comunicación y c) Gestión educacional.

Dentro de la gestión de comunicación, queremos ofrecer parte de nuestro *know-how* mediante la publicación de procedimientos que puedan ser de interés para todos aquellos relacionados con el mundo de las microalgas. Es por eso, que en esta primera publicación se recopilan algunos de los protocolos utilizados para el trabajo con microalgas en diferentes disciplinas. Es nuestra intención seguir recopilando más protocolos de los centros que componen la red RENUWAL y ponerlos al servicio de aquellos interesados.

Agradecemos la ayuda que la Cyted nos ha brindado para que este proyecto pueda hacerse realidad, tanto por la concesión de la red como por ayudarnos durante todo el proceso de publicación. Para cualquier sugerencia, pregunta o aclaración pueden ustedes dirigirse por mail a las editoras. Esperemos que les guste esta iniciativa y la encuentren de utilidad.

Editoras:

JUANA MARÍA NAVARRO LLORENS (UCM) jmnavarr@ucm.es

LUISA GOUVEIA (LNEG) luisa.gouveia@lneg.pt

Contenido

Protocolo de cultivo de la microalga *Botryococcus braunii*5

Andrés Alonso Arbeláez Pérez, Néstor David Giraldo Calderón, Lucía Atehortúa Garcés

Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación12

Patricia Laura Marconi, Myriam Zawoznik, María Daniela Groppa, Laura I. de Cabo

Flow cytometry-assisted method for cell disruption of microalgae.....18

Daniel Figueiredo, Teresa Lopes da Silva, Alice Ferreira, Alberto Reis, Luisa Gouveia^{1,2}

Conjugación triparental en cianobacterias.....29

Sara Baldanta Callejo, Govinda Guevara, Juana María Navarro Llorens

Determinación de fosfato disuelto e intracelular en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis* orientados a la producción de lípidos neutros para biodiesel.....37

Ana M. Martínez, Lucas A. Martín, Cecilia A. Damiani, Paolo M. Díaz Godoy, Patricia I. Leonardi, Cecilia A. Popovich

Identificación y cuantificación de clorofila *a* y fucoxantina en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca (Pcia. de Buenos Aires, Argentina).....47

M. Alejandra Sequeira, M. Belén Faraoni, Ana M. Martínez, M. Cecilia Damiani, Patricia Leonardi, Cecilia A. Popovich

Analysis of microalgae lipids from adapted Bligh Dyer followed by derivatization and GC-MS analysis.....56

Gisele Alves, Maiara Priscilla de Souza, Liange Reck, Carlucio Roberto Alves, Rosana de Cassia de Souza Schneider

Determinación de carbohidratos totales por fenol-sulfúrico (DuBois-Gilles-Hamilton)62

Enrique Romero Frasca, Germán Buitrón

Protocolo de Preparación y Evaluación de Pilas de Combustible de Óxido Sólido69

Araceli Fuerte, Rita X. Valenzuela, Paloma Ferreira-Aparicio, Beata Bochentyn

Método de cálculo del potencial bioquímico de metano (BMP), mediante el equipo AMPTS II, para la investigación en digestión anaeróbica.84

Juan Luis Ramos, Nely Carreras

Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación

Patricia Laura Marconi¹, Myriam Zawoznik², María Daniela Groppa³, Laura I. de Cabo⁴

¹CONICET, CEBBAD-Univ. Maimónides, Hidalgo 775, Buenos Aires, Argentina;

²FFyB, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina

³IQUIFIB-CONICET, FFyB, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina

⁴Museo Argentino de Ciencias Naturales “B. Rivadavia”-CONICET, Buenos Aires, Argentina

Correspondencia: marconi.patricialaura@maimonides.edu

RESUMEN

Se detalla el protocolo para obtener microalgas inmovilizadas en alginato de sodio. El cultivo de microalgas inmovilizadas en alginato de sodio ha mostrado ser eficiente para obtener mayores rendimientos en los procesos de biorremediación. El presente protocolo describe la obtención de perlas de alginato con concentraciones conocidas de *Chlorella vulgaris* inmovilizada.

INTRODUCCIÓN

La inmovilización de la biomasa microalgal en diversos soportes tales como el alginato, agar-agar, celulosa y sílica-gel, entre los más utilizados [1-5] protege las microalgas de los efectos tóxicos de los contaminantes presentes en el agua, manteniendo el pH y evitando temperaturas extremas, permitiendo una mayor eficiencia en la producción de biomasa y sobrevivida [6]. En particular, el alginato es una matriz de polisacáridos especialmente útil para la elaboración de cápsulas esféricas, comúnmente denominadas “perlas”. Además, las células entrampadas en la matriz ocupan un volumen pequeño y definido -las perlas tienen un tamaño de 1 a 1,5 cm de diámetro- y son fáciles de manipular confiriendo una estabilidad operacional al sistema (Figura 1A). Otra ventaja, es mantener una comunicación célula-célula generalmente obtenida por moléculas señal disueltas en la matriz que las contiene. En nuestro caso, la principal ventaja de la inmovilización de las microalgas en alginato fue obtener mayor biomasa y facilitar su recuperación (Figura 1B). Las perlas no sólo contribuyen a la resolución de aspectos estrictamente técnicos relacionados con la ingeniería del proceso (“scaling-up”), sino que evitan la liberación de células al medio y, por ende, los potenciales peligros de eutrofización del sistema e introducción de especies exóticas. Además, el uso de las perlas contribuye con la cosecha de la biomasa, haciendo este proceso menos costoso.

A



B

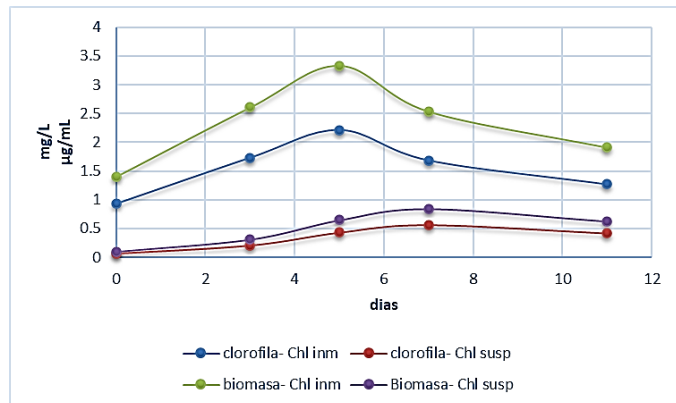


Figura 1. Cultivos de microalgas de *C. vulgaris* alimentados con agua del Lago Lugano. A) perlas de alginato conteniendo células al 2% (P:V); B) comparación del crecimiento obtenido por cultivos en suspensión (Chlsusp) o inmovilizados (Chlinm) en perlas de alginato. Biomasa, estimación por peso seco (mg/L); concentración de clorofila (µg/mL). Obtenido de Groppa et al. (2019) [7].

El presente protocolo describe la obtención de perlas de alginato conteniendo una concentración conocida de microalgas. Además, se describe el protocolo para liberar las algas del alginato.

Protocolo de inmovilización de *Chlorella vulgaris*

1. Disolver alginato de sodio en agua estéril al 10%. Utilizar un mixer o procesadora hogareña para tal fin. La solución debe quedar translúcida. Autoclavar la solución a 0,10 MPa por 15 min.
2. Preparar una suspensión de algas creciendo en fase exponencial. La concentración puede variar entre 1 a 6 x 10⁶ células/ml en medio de cultivo sintético. Se puede obtener esta suspensión filtrando con papel de filtro estéril o centrifugar en condiciones de esterilidad (menor a 5000 g por 10 min) y resuspender en medio hasta obtener la densidad deseada.

Nota: Cultivo suspensión de *C. vulgaris*: medio MS, con el agregado de sacarosa (3 %) y suplementado con el regulador de crecimiento AIA (ácido indol acético, 1 mg/L) [8]. Los medios de cultivo se dispensan en Erlenmeyers de 250 mL (50 mL en cada uno) y se mantienen en agitación constante (100 rpm) para su oxigenación. Las incubaciones se realizan a 24±2 °C, con fotoperíodo de 16:8 luz:oscuridad con una intensidad PAR de 400 µmol.m⁻²s⁻¹. El crecimiento se evalúa mediante peso fresco de biomasa, densidad óptica a 600 nm de longitud de onda y recuento en cámara de Neubauer.

3. Mezclar la solución de *C. vulgaris* obtenida en el ítem 2 con alginato de sodio 2% estéril en relación 20:80 (V:V).

Nota: se almacena el alginato al 10 % estéril. La dilución correspondiente se realiza según la siguiente fórmula.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

4. Mezclar durante 15 minutos sobre un agitador electromagnético (“magnetic stirrer”).

5. Gotear la mezcla con una aguja de 2.0 mm de diámetro de salida sobre una solución 2% de CaCl₂ estéril en agitación suave (medio de gelificación) sobre un agitador electromagnético. Alternativa para grandes volúmenes a preparar: utilizar una bomba peristáltica con una vía estéril.
6. Incubar las bolillas formadas en CaCl₂ 2% estéril en agitación rotatoria (60-100 rpm) durante 1 h a 22 °C.
7. Descartar el medio y lavar las bolillas tres veces con 10 vol. de solución salina estéril (0.85% NaCl) en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 20 minutos cada uno cambiando el medio durante cada lavado.

Recuperación de la biomasa inmovilizada: una vez finalizado el proceso de biorremediación, se cosechan las perlas con la microalga inmovilizada y se recupera la biomasa por dos mecanismos posibles.

1. Por redisolución de la matriz:
 - a. Triturar en forma mecánica y suavemente las bolillas en un pequeño volumen de buffer fosfato KH₂PO₄/Na₂HPO₄, 1 M y pH 6,5 (relación aproximada de 1 bolilla:1ml). Se puede utilizar Eppendorf y un pilón o *pestle* (Bel-Art®) para una muestra de 10 bolillas
 - b. Centrifugar las suspensiones a 2500 rpm durante 10 minutos.
2. Por disgregación mecánica de la matriz
 - a. Triturar mecánicamente las bolillas en un pequeño volumen de medio
 - b. Diluir la suspensión en medio de trabajo.
 - c. Centrifugar la suspensión a 2500 rpm durante 10 minutos.

RESULTADOS

Entre los contaminantes que más impactan en el medio ambiente se describe el exceso de las especies químicas nitrogenadas y fosforadas responsables de causar la eutrofización de las aguas trayendo aparejado un desbalance en el ecosistema. Para probar la eficiencia del cultivo de las microalgas inmovilizadas se llevaron a cabo cultivos utilizando biorreactores tipo tanque agitado (Minifors, Infors HT®, Switzerland) con un vaso de 2 L y agitación por paleta marina (100 rpm), con sistema de control de pH y aireación por burbujeo ("sparger") con una bomba a 0,5 vvm. El biorreactor fue alimentado con agua del lago Lugano (sector correspondiente a las coordenadas 34°40'50.80"S y 58°26'44.10"O) o medio sintético (MS suplementado con AIA 1 mg/L, sacarosa 3 %) [9].

La cinética de crecimiento se basó en muestreos diarios de 10 perlas de alginato a lo largo de 14 días, donde se cuantificó el número de células inmovilizadas en cada bioproceso (Tabla 1).

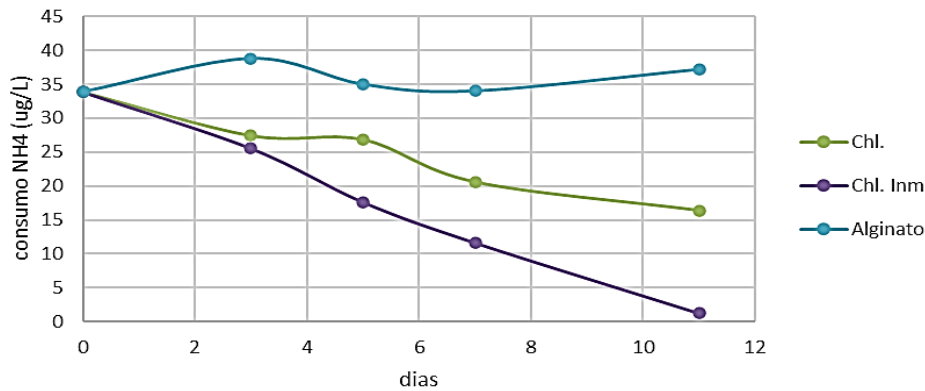
El medio de cultivo MS con 3% de sacarosa fue el más adecuado para generar biomasa con un tiempo de duplicación de 3 días.

Además, se observa una disminución significativa del contenido de amonio y fósforo en los mismos ensayos respecto al control (perlas de alginato sin microalgas) (Figura 2). Cabe destacar que se obtuvieron mejores resultados en los sistemas con algas inmovilizadas respecto a los cultivos de las mismas algas en suspensión [9]. A los 11 días de cultivo, se consume casi el total del amonio y más del 80% del fósforo total en los tratamientos con microalgas inmovilizadas.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de *Chlorella vulgaris* inmovilizada en perlas de alginato, en biorreactores alimentados con agua del lago Lugano. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p \leq 0,05$). RGR: Tasa específica de crecimiento (peso final-peso inicial/peso inicial), μ : velocidad de crecimiento (peso final-peso inicial/días en cultivo), dt: tiempo de duplicación. MS, medio sintético MS; ALL: agua del Lago Lugano. Los cálculos cinéticos se realizaron con “FermenterTool software 2018” (www.fermentertool.com/en/).

	MS	ALL
RGR	73,3*	9,7*
μ (d^{-1})	0,214*	0,090*
dt (d)	3	8

A



B

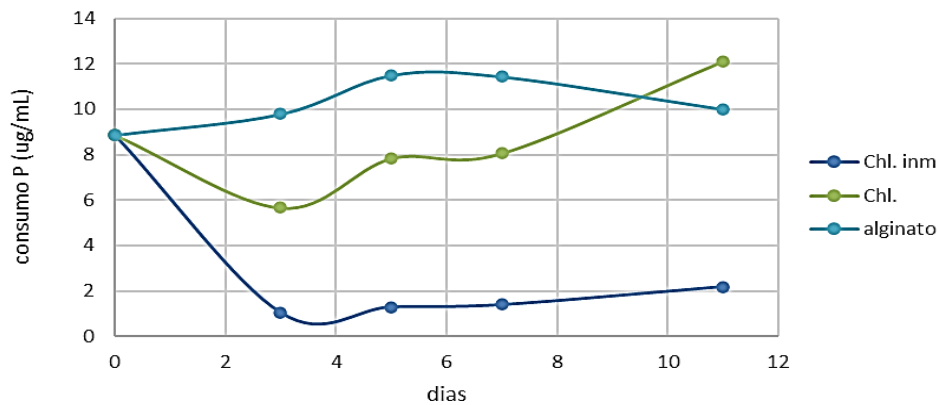


Figura 2. Consumo de nitrógeno amoniacal (A) y fósforo total, (B) en agua del Lago Lugano luego de cultivar *C. vulgaris* en suspensión (Chl.) o inmovilizadas en perlas de alginato (Chl. Inm) respecto al control de perlas de alginato sin células (Alginato). Obtenido de Trentini et al. (2017), [9].

El pH inicial en las muestras de agua del lago Lugano fue de 9, lo cual puede traer como consecuencia la formación de amoníaco y el desacople de la cadena de electrones en el fotosistema II ([10], Tabla 2). El valor de pH disminuye al finalizar el bioproceso, lo

cual reduce los riesgos de toxicidad por presencia de amoniaco.

Finalmente, también se pudo observar que en presencia de *C. vulgaris* inmovilizada hubo una reducción de la concentración de plomo (90%); cadmio (65%); cobalto (más de 50%) y cromo (50%) en el agua. De esta manera, el contenido de metales en el agua queda dentro de los valores admisibles propuestos por la “American Public Health Association” (APHA, 2005) (Tabla 2). Algunas microalgas tienen la capacidad de acumular en su interior metales pesados y de degradar algunos compuestos orgánicos. Está descrito que los metales pueden adsorberse a la pared celular de la microalga *C. vulgaris*. Los grupos químicos funcionales como amino, hidroxilo, ácidos, entre otros, de la pared celular atraen por diferencia de cargas a los metales inmovilizándolos en la superficie celular [12-15]. El proceso de inmovilización en alginato no impidió la remoción de metales de las muestras de agua.

Tabla 2. Evaluación del efecto biorremediador de *Chlorella vulgaris* sobre el agua del lago Lugano en biorreactores. Valores de referencia de APHA (2005) [11].

	Valores iniciales	bioproceso	Valores de referencia
pH	9	8,4	6,5/9
Hierro (ppm)	0,30	0,3	0,3
Cobalto (ppm)	0,08	ND	ND
Plomo (ppm)	165,00	6,0	50,0
Cadmio (ppm)	4,00	<2	10,0

CONCLUSIONES

- Nuestro modelo de contaminación ambiental fue el agua proveniente del lago Lugano, CABA. El conjunto de trabajos publicados permitió demostrar que microalgas inmovilizadas en perlas de alginato permite biorremediar estas aguas en el término de 5 días en sistemas confinados como son los Erlenmeyers y los biorreactores.
- Las ventajas de trabajar con perlas de alginato fueron facilitar la manipulación y aislamiento de las células, permitiendo su crecimiento en forma simultánea con la remoción de los elementos contaminantes medidos, en especial nutrientes inorgánicos y metales pesados.
- La tecnología se presenta como una alternativa potencialmente aplicable a espacios abiertos para su biorremediación y posterior remoción, evitando la eutrofización del sistema.

AGRADECIMIENTOS: a los estudiantes Lic. Andrea Trentini, Lic. Daniel Orozco, Ing. Juan Sanchez Novoa

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, Lebsky V, Bustillos JJ (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when coimmobilized in alginate beads with the microalgae-growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol* 48, 514–521.
- [2] Bashan LE, Bashan Y (2008). Joint Immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant–bacterium interactions. *Appl Environ Microbiol* 74, 6797–6802.
- [3] Bashan LE, Bashan Y (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technol* 101, 1611–1627-
- [4] Perullini M, Ferro Y, Durrieu C, Jobbagy M, Bilmes SA (2014). Sol–gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors. *Journal of Biotechnology* 179, 65-70.
- [5] Durrieu C, Ferro Y, Perullini M, Gosset A, Jobbágy M, Bilmes SA (2016). Feasibility of using a translucent inorganic hydrogel to build a biosensor using immobilized algal cells. *Environmental Science and Pollution Research* 23(1), 9-13.
- [6] El-Sheekh MM, Metwally MA, Allam NG, Hendam HE (2017). Effect of Algal Cell Immobilization Technique on Sequencing Batch Reactors for Sewage Wastewater Treatment. *Int J Environ Res* 11, 603. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0053-z>
- [7] Groppa MD, Trentini A, Zawoznik M, Bigi R, Nadra C, Marconi PL (2019). Optimization of a bioremediation strategy for an urban stream of Matanza-Riachuelo basin. *Int J Environ Ecol Eng* 13, 418-424.
- [8] Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- [9] Trentini A, Groppa MD, Zawoznik M, Bigi R, Perelman PE, Marconi PM (2017). Biorremediación del lago Lugano de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires por algas unicelulares – estudios preliminares para su posterior utilización. *Terra Mundus* 4. <http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/handle/123456789/4302>.
- [10] Collos Y, Harrison PJ (2014). Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine pollution bulletin*, 80, 8-23.
- [11] APHA. American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Ed., Washington DC: American Public Health Association. Accessed 2005.
- [12] Monteiro CM, Castro PM, Malcata FX (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol Progress* 28, 299-311.
- [13] Kaplan, D (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In: Richmond A, Hu Q (Ed) Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology John Wiley & Sons, New York.
- [14] Ferraro G, Toranzo RM, Castiglioni DM, Lima Jr E, Mansilla MV, Fellenz NA, Bagnato C (2018). Zinc removal by *Chlorella* sp. biomass and harvesting with low-cost magnetic particles. *Algal Research* 33, 266-276.
- [15] Sayadi MH, Rashki O, Shahri E (2019). Application of modified *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* powder on the adsorption of heavy metals from aqueous solutions. *J Environ Chem Eng* 7, 103169.